УДК 576.893.192.1.599.323.4

ПОРАЖЕНИЯ СЕЛЕЗЕНКИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ, ВЫЗВАННЫЕ ЭНДОЗОИТАМИ TOXOPLASMA GONDII ПРИ ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНВАЗИИ. ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ, ИММУНОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ И ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

А. К. Шустров, Т. Н. Хавкин, В. Г. Селиверстова

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Прослежены реакции системы мононуклеарных фагоцитов селезенки на заражение и на судьбу эндозоитов в активированных клетках этой системы. Активация мононуклеарных фагоцитов не препятствует размножению в них эндозоитов токсоплазм вирулентного штамма.

Заражение белых мышей эндозоитами вирулентных штаммов *Toxoplasma gondii* приводит к развитию генерализованной инфекции с размножением паразитов в клетках системы мононуклеарных фагоцитов (МФ). Наряду с размножением эндозоитов наблюдается активация клеток этой системы в виде усиления их фагоцитарной и переваривающей активности, а также активности их лизосомальных энзимов (Glowinski e. a., 1966; Reikvam, 1976; McLeod, Remington, 1977). Активацию МФ рассматривают как этап развития антитоксоплазменного иммунитета (McLeod, Remington, 1977; Hoff, Frenkel, 1974). Однако при заражении мышей эндозоитами вирулентных штаммов токсоплазм активация МФ и даже полностью сформировавшийся специфический клеточный иммунитет не всегда могут предотвратить прогрессирование инфекции, которая приобретает характер сепсиса и завершается гибелью мышей (Hof e. a., 1976). Поэтому токсоплазменная инфекция белых мышей может быть использована в качестве экспериментальной модели для выявления тех факторов патогенности эндозоитов, с помощью которых вирулентные штаммы токсоплазм преодолевают защитные механизмы хозяина.

Для решения этого вопроса необходимо проследить взаимодействие эндозоитов с клетками МФ, происходящее на фоне уже развившейся активации МФ, т. е. в очагах диссеминации эндозоитов, которые обычно образуются во внутренних органах не ранее 2—3-го дня после заражения. Из литературы известно, что при этом в процесс закономерно вовлекаются селезенка и другие органы, богатые клетками системы МФ. Электронномикроскопически прослежено размножение эндозоитов в ретикулярных клетках селезенки и тимуса (Tichy, Peychl, 1968; Pelster e. a., 1976). Однако данные о реактивных процессах в гематогенно возникших паразитарных очагах и о деталях взаимодействия эндозоитов с МФ в этих очагах в настоящее время отсутствуют. Выяснение упомянутых вопросов и составляет задачу данной работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основным объектом исследования послужила селезенка белых мышей, зараженных эндозоитами *T. gondii* (штамм RH) внутрибрюшинно. Наши предыдущие исследования показали, что при таком способе заражения паразиты закономерно появляются в МФ селезенки на 2—3-й день (Шустров и др., 1968, Хавкин, Шустров, 1974). В данной работе гистологически была изучена селезенка 73 мышей весом 14—18 г, убитых через 24, 48, 72, 96 и 120 ч после заражения мышиным перитонеальным экссудатом. Каждому животному вводили по 0.1 мл экссудата, содержащего 4×10^6 эндозоитов/мл. Исследовали парафиновые (фиксация формалином) и свежезамороженные криостатные срезы, фиксированные ацетоном. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Романовскому Гимзе, криостатные — периодатлейкофуксином (ШИК-реакция) и обрабатывали по прямому методу Кунса флуоресцирующим антитоксоплазменным кроличьим гамма-глобулином так, как описано ранее (Шустров и др., 1968).

Для электронно-микроскопического исследования взяты кусочки селезенки 15 мышей, убитых в указанные выше сроки. Кусочки фиксировали 2%-ным глютаральдегидом с дофиксацией 1%-ным OsO_4. Контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инфекционный процесс протекал у зараженных животных так же, как в опытах, описанных ранее (Хавкин, Шустров, 1974). В первые 2 дня брюшина зараженных мышей казалась неизмененной, печень и селезенка были несколько увеличены в размерах. При микроскопическом исследовании в 1-е и 2-е сутки после заражения отмечалось увеличение герминативных центров фолликулов селезенки и расширение полей красной пульпы между фолликулами. Эндозоиты токсоплазм были обнаружены в селезенке впервые с помощью флуоресцирующих антител через 48 ч после заражения. В этот срок и через 72 ч встречались одиночные паразиты и небольшие колонии. Через 92 ч обнаруживались крупные, частью распадающиеся колонии и одиночные паразиты (рис. *1—4* см. вклейку). С этого срока у мышей развивались явления интоксикации. Часть животных погибала. Через 120 ч в селезенке выживших мышей преобладали одиночные эндозоиты, в большом количестве рассеянные по всей ткани селезенки. Отмечался массовый распад клеток красной пульпы.

При электронно-микроскопическом исследовании в сроки 24—48 ч после заражения в пульпе селезенки преобладали свободные макрофаги и оседлые (ретикулярные) клетки с признаками активации. К этим признакам прежде всего относились обилие рибосом и полирибосом, а также развитые митохондрии с высокими криптами, частью разрушающимися. Многие макрофаги и ретикулярные клетки содержали большое количество пиноцитарных пузырьков, развитые комплексы Гольджи, плотные тела типа лизосом.

Электронно-микроскопически эндозоиты токсоплазм удавалось обнаружить только со срока 72 ч. В этот срок наряду с активированными МФ в селезенке имелись и распадающиеся лимфоциты и макрофаги. Отмечался фагоцитоз отмирающих клеток макрофагами. Во всех клетках с одиночными паразитами или с небольшими колониями эндозоитов были резко выражены признаки активации, перечисленные выше (рис. 2). К паразитофорным вакуолям в таких клетках тесно примыкали цистерны эндоплазматической сети и развитые митохондрии. Скопления пиноцитарных пузырьков в цитоплазме клетки хозяина вблизи мембраны паразитофорной вакуоли, равно как и разрастания микроворсинок на внутренней поверхности этой мембраны, указывали на активный обмен веществ между эндозоитами и клеткой хозяина, идущий через содержимое паразитофорной вакуоли. Наиболее густые разрастания микроворсинок определялись на тех участках стенки паразитофорной вакуоли, которые обращены к коноиду паразитов. На этих участках определялись также и дополнительные мембраны, что придавало стенке вакуоли многослойный характер. Во многих инфицированных клетках имелось большое количество крупных плотных тел типа лизосом, однако нигде не отмечено контакта между лизосомами и паразитофорной вакуолью.

В МФ со сравнительно крупными паразитарными колониями отмечалось исчезновение рибосом, расширение цистерн гладкой сети, наличие участков разрежения матрикса цитоплазмы, встречались капли липидов, аутофагосомы (рис. *3*). Многие митохондрии, особенно те, которые концентрировались вокруг паразитофорных вакуолей, были вакуолизированы, крипты их разрушены или колбовидно раздуты. Встречались отдельные паразитофорные вакуоли с разрывами мембраны. Края разрывов терялись в матриксе цитоплазмы клетки хозяина. Через образовавшиеся дефекты в полость паразитофорной вакуоли проникали цитоплазма клетки хозяина и ее органоиды. Если лизис мембраны происходил в клетке с признаками активации, то паразитофорная вакуоль оказывалась заполненной рибосомами и обрывками цистерн сети и митохондриями, которые распределялись между эндозоитами.

В срок 96 ч в пульпе селезенки был резко выражен распад лимфоцитов и МФ, в том числе активированных. В синусах среди обломков клеток определялись нити фибрина и склеивающиеся тромбоциты. Паразитарные колонии в клетках были крупных размеров. В этот срок в клетках были выражены признаки повреждения: разрежение матрикса цитоплазмы, убыль органоидов, вздутие цистерн сети, свидетельствующие о внутриклеточном отеке. Отдельные органоиды и участки матрикса цитоплазмы были изолированы от остальной цитоплазмы двойными мембранами (рис. 3), что указывает на формирование аутофагосом при помощи цистерн гладкой сети. В клетках с выраженными признаками повреждения стенка паразитофорной вакуоли состояла из одной мембранной единицы. В ней определялись разрывы.

В срок 120 ч отмечен массовый распад клеток пульпы селезенки, лимфоцитов и МФ. Встречались одиночные распадающиеся полинуклеарные лейкоциты. Синусы были переполнены эритроцитами. Наблюдались многочисленные мелкие скопления тромбоцитов, частью разрушающихся, склеенных между собой. Среди обломков клеток были рассеяны многочисленные свободные эндозоиты (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В развитии острой токсоплазменной инвазии белых мышей четко выделяется 3 этапа: 1) размножение эндозоитов в области инокуляции, сопровождающееся активацией системы МФ; 2) рассеивание эндозоитов по организму и их размножение в клетках многих органов и 3) септическое состояние с массовым распадом инфицированных клеток и лимфоцитов на фоне общей интоксикации. Такое развитие процесса ведет к тому, что к моменту диссеминации эндозоитов (24—48 ч после заражения) МФ селезенки, в которые внедряются паразиты, уже активированы благодаря наличию паразитарного очага в брюшине.

Морфологическое исследование подтвердило экспериментальные наблюдения других авторов (McLeod, Remington, 1977; Hoff, Frenkel, 1974; Hof e. a., 1976; Jones e. a., 1977), что сама по себе активация МФ не препятствует прогрессированию инфекции. На этапе генерализации эндозоиты поселяются в активированных МФ и развиваются в них так же, как в неактивированных клетках, вызывая образование клеткой хозяина микроворсинок, способствующих лучшему обмену веществ этой клетки с паразитом. Преобразованные в активированной клетке лизосомы также не мешают развитию эндозоитов.

При размножении эндозоитов в активированных МФ еще более наглядно, чем в неактивированных (Шустров и др., 1979), проявилась способность паразитов вызывать лизис мембраны паразитофорной вакуоли. То, что лизис возникает не только в крупных, но и в сравнительно небольших вакуолях, находящихся в активированных клетках, указывает скорее на энзиматический механизм лизиса, чем на простой механический разрыв мембраны. Тем самым подтверждается предположение, что способность разрушать мембрану паразитофорной вакуоли представляет собой фактор патогенности эндозоитов, обеспечивающий их переход из клетки в клетку и создающий предпосылку для септического развития инфекции. Одной из задач дальнейших исследований должно быть выяснение вопроса, способны ли эндозоиты маловирулентных штаммов разрушать мембрану паразитофорной вакуоли и сохраняют ли эту способность эндозоиты вирулентных штаммов при их превращении в цистозоитов. Представляется вероятным, что способность лизировать мембрану свойственна только эндозоитам вирулентных штаммов токсоплазм и является одним из тех факторов патогенности паразита, который определяет его вирулентные свойства.

Изменения, обнаруживаемые в селезенке на поздних этапах инфекции и совпадающие по времени с развитием общетоксических явлений, обусловлены разными параллельно действующими механизмами: а) непосредственным воздействием размножающихся паразитов на клетку хозяина, б) общерезорбтивным действием токсических продуктов эндозоитов, в) местным повреждающим действием токсических продуктов на ткань селезенки. Результатом роста вакуоли с размножающимися паразитами является атрофия цитоплазмы и органоидов инфицированных клеток и в конечном счете их гибель. Подобные картины мы наблюдали и в сальнике при внутрибрюшинном заражении эндозоитами белых мышей. С общерезорбтивным действием токсических продуктов паразита следует связать массовый распад лимфоцитов. Генри и Беверли (Henry a. Beverley, 1976), которые также наблюдали распад лимфоцитов, объясняют его непосредственным действием токсических продуктов на лимфоциты. Однако то, что распад лимфоцитов происходит и в других лимфоидных органах, явно вне связи с непосредственным присутствием токсоплазм (Tichy, Peychl, 1968; Хавкин, Шустров, 1974), возникновение распада лимфоцитов при интоксикациях иной природы (Бибинова и др., 1963) указывает на неспецифический характер этого явления. Известно, что массовый распад лимфоцитов возникает при стрессе в связи с избыточным поступлением в кровь кортикостероидов (La Pushin, Harven, 1971). Что же касается тяжелого повреждения МФ, инфицированных и не инфицированных с развитием некроза и образованием микротромбов, то эти явления, действительно, связаны с местным некротическим действием токсических продуктов эндозоитов. В пользу этого взгляда, совпадающего с точкой зрения других исследователей (Hogan e. a., 1971), говорят: а) образование одновременно с массовым разрушением клеток селезенки также и очаговых некрозов печени в местах выхода паразитов из разрушенных МФ (Хавкин, Шустров, 1974), б) срок возникновения некрозов (4—5-й день после заражения). Из литературы известно, что очаговые некрозы ткани, возникающие при хроническом рецидивирующем токсоплазмозе человека, возможно, обусловлены действием иммунного комплекса, образующегося в местах выхода токсоплазм из разрушенных цист (Frenkel, 1974). Однако в те сроки, когда возникает некроз при острой инфекции белых мышей, участие иммунологических механизмов в его развитии можно исключить. Отсутствие заметного притока полинуклеарных лейкоцитов в селезенку в терминальной стадии инфекции делает маловероятным участие лейкоцитарных лизосом в развитии некроза. Надо полагать, что способность вызывать некроз ткани хозяина наряду со способностью вызывать лизис мембран паразитофорной вакуоли представляет собой еще один фактор патогенности, который отличает эндозоиты токсоплазм вирулентных штаммов от маловирулентных и способствует преодолению ими защитных механизмов хозяина.

Литература

Бибинова Л. С., Копытовская Л. П., Букина А. П. 1963. О распаде лимфоцитов при экспериментальной стафилококковой интоксикации. — Ежегодник ИЭМ, 7 (8) : 292—295.

Хавкин Т. Н., Шустров А. К. 1974. Развитие очаговых изменений во внутренних органах белых мышей при острой экспериментальной токсоплазменной инвазии. — Паразитол. сб. Зоол. ин-та АН СССР, 26 : 249—255.

Шустров А. К., Селиверстова В. Г., Хавкин Т. Н. 1979. Взаимодействие эндозоитов Toxoplasma gondii с клетками сальника белой мыши при острой токсоплазменной инвазии. Электронно-микроскопическое исследование. — Паразитология, 13 (6) : 593—598.

Шустров А. К., Хавкин Т. Н., Святухина О. А. 1968. Развитие Toxoplasma gondii и связанные с этим реактивные процессы в брюшине белых мышей. — Паразитология, 2 (1) : 83—90.

Frenkel J. K. 1974. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. — Bull. N. Y. Acad. med. Ser. 2, 50 : 182—191.

Glowinski M., Steplenski Z., Waronski W. 1966. Das R. E. System (RES) bei experimentellen Toxoplasmose. — Zbl. Gynekol., 88 (24) : 777—786.

Henry L., Beverley J. K. A. 1976. The response of the mouse R. E. — System to Infektion with Toxoplasma gondii. — Virch. Arch. B., 20 : 55—70.

Hof H., Hohne K., Seeliger H. P. 1976. Macrophage function and host resistance against infection with Toxoplasma gondii. — Can. J. Microbiol., 22 : 1453—1457.

Hoff R. L., Frenkel J. K. 1974. Cell-mediated immunity against Besnoitia and Toxoplasma. — J. exp. Med., 139 : 560—580.

Hogan M. J., Moshini G. B., Zardi O. 1971. Effects of Toxoplasma gondii toxin on the rabbit eye. — Amer. J. Ophthalmol., 72 : 733—742.

Huldt G., Gard S., Olovson S. G. 1973. Effect of Toxoplasma gondii on the thymus. — Nature (Lond.) 244 : 301—303.

Jones T. C., Masur H., Len L., Fu T. L. T. 1977. Lymphocyte-macrophage interaction during control of intracellular parasitism. — Amer. J. Trop. Med. Hyg., 26 : 187—193.

LaPushin R. W., Harven E. 1971. A study of glucocorticosteroid—induced pycnosis in the thymus and lymph node of the adrenalectomized rat. — J. Cell. Biol., 50 : 583—597.

McLeod R., Remington J. S. 1977. Influence of Infection with Toxoplasma gondii on macrophage function. — Amer. J. Trop. Med. Hyg., 26 : 170—182.

Pelster B., Piekarski G., Suzuki N. 1976. Zur Histopathologie des Thymus der weissen. Maus bei einer Infektion mit Toxoplana gondii. — Z. Parasitetenk., 49 : 113—125.

Reikvam A. 1976. Macrophage proliferation and activation during Toxoplasma gondii infection in mice. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 84 : 124—130.

Tichy J., Peychl D. 1968. Electron microscopic findings in the spleen of mice in acute toxoplasmosis. — Pathol. Microbiol., 31 : 307—318.

LESION OF SPLEEN OF WHITE MICE CAUSED BY ENDOZOITES OF TOXOPLASMA GONDII AT THE ACUTE EXPERIMENTAL INFECTION. HYSTOLOGICAL, IMMUNOLUMINESCENT AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES

A. K. Shustrov, T. N. Khavkin, V. G. Seliverstova

SUMMARY

The spleen of 73 white mice was studied (15 mice were studied by electron microscopy) from 24 to 120 hours after intraperitoneal infection. The successive stages of interaction of parasites with cells of mononuclear phagocytes system were observed. At the early stages of the infection the activation of these cells takes place. During the dissemination of endozoites over the host organism they penetrate the activated mononuclear phagocytes. Activation, however, is not effective enough since in these cells the parasites preserve the ability to hinder the fusion of lysosomes with phagosomes containing endozoites and at later stages of the infection to lyse the membrane of parasitophore vacuole. The ability to reproduce in activated mononuclear phagocytes and to lyse the membrane of parasitophore vacuole is regarded as a factor of the virulence of endozoites of RH strain toxoplasms.

К ст. А. К. Шустров и др.

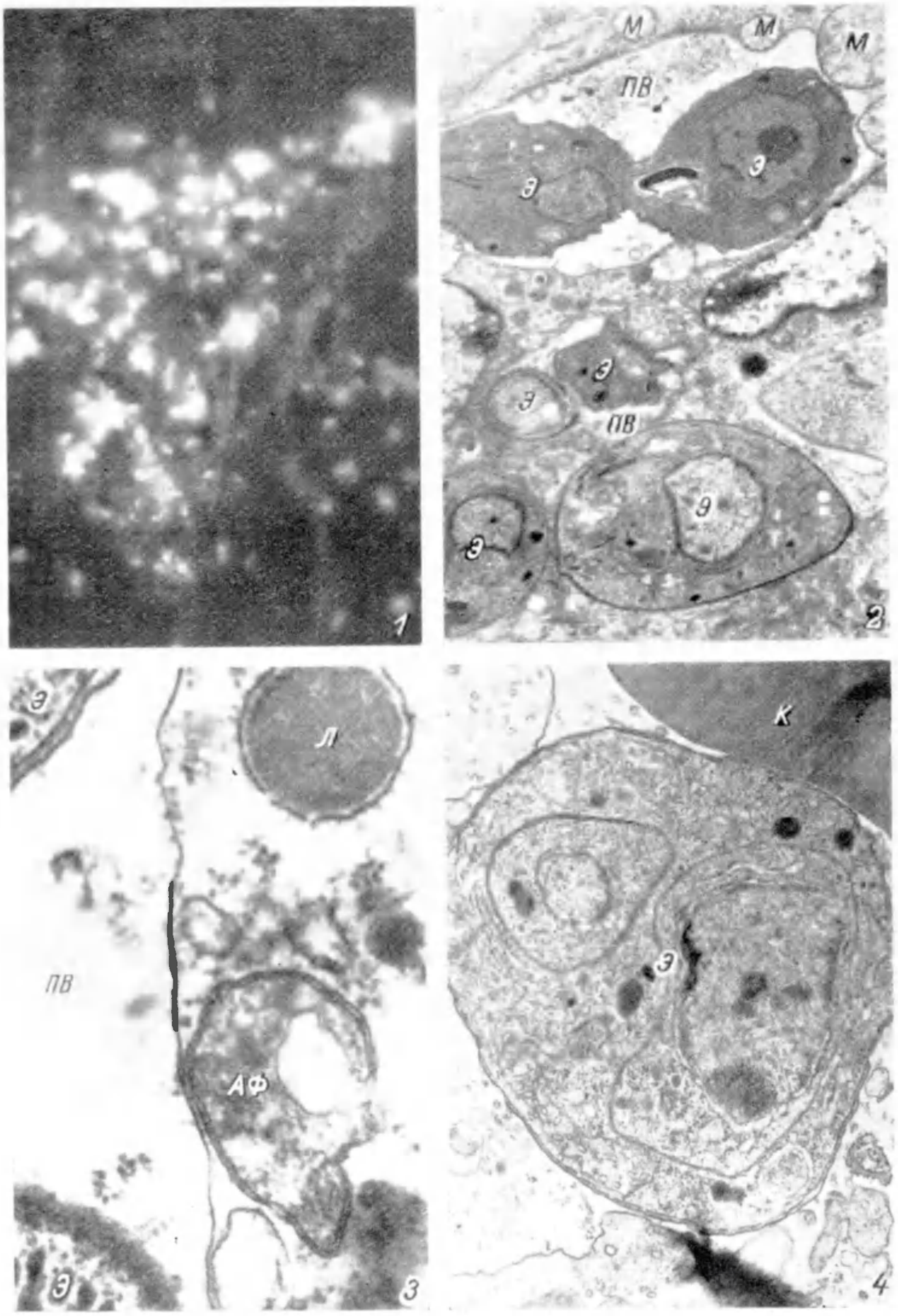

Рис. 1—4.

1 — специфическая люминесценция паразитарных колоний и отдельных паразитов в пульпе селезенки мыши, 96 ч после заражения. Криостатный срез, обработка по прямому способу Кунса. 900×; 2 — эндозоиты (Э) токсоплазм в паразитофорных вакуолях (ПВ) и непосредственно в цитоплазме ретикулярных клеток селезенки. Обилие рибосом и гипертрофия митохондрий (М) в инфицированных клетках. 72 ч, 5000×; 3 — часть паразитофорной вакуоли (ПВ) с эндозоитами (Э) токсоплазм в ретикулярной клетке. Аутофагосома (АФ) и лизосома (Л) в разреженной цитоплазме клетки хозяина. 96 ч, 15 000×; 4 — свободный эндозоит (Э) в просвете синуса селезенки среди обломков разрушенных клеток и эритроцитов (К). 96 ч, 15 000×.